

BACTERIAS

FITOPATÓGENAS:

¿ES POSIBLE SU PREVENCIÓN?



Figura 1. Síntomas de tumores en olivo causados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. (Foto A. García)

**Ramón Peñalver,
Pablo Llop,
Ester Marco-Noales
y María Milagros López.**

Equipo de Bacteriología,
Centro de Protección Vegetal y
Biotecnología,
Instituto Valenciano de Investigaciones
Agrarias (IVIA).

Las bacterias fitopatógenas causan enfermedades en plantas cultivadas y producen anualmente cuantiosas pérdidas en todos los países de la Unión Europea (UE), incluida España. Sin embargo, los estudios sobre estas bacterias y las enfermedades que producen se iniciaron en España más tarde que en otros países europeos. En 1920, E.F. Smith, considerado como el padre de las bacterias fitopatógenas, en su libro “*Bacterial diseases of plants*”, describió las enfermedades conocidas en distintos países y en referencia al nuestro indicaba “Spain is a terra incognita”. Esta ausencia de información sobre las bacteriosis en España continuó hasta finales de la década de los 60, ya que fueron escasos los trabajos publicados sobre estas enfermedades.

El Laboratorio de Bacteriología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias fue creado en 1977 y desde entonces ha abordado proyectos relacionados con el diagnóstico, la epidemiología y el control biológico de distintas bacterias fitopatógenas. Estos proyectos han ido siempre encaminados a conocer la situación real de las enfermedades bacterianas presentes en España y a prevenir su introducción, o si estaban ya introducidas, su diseminación, mediante distintos métodos. Además, es desde 1993 el Laboratorio de Referencia para Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino.

Correspondencia: **María Milagros López.**
IVIA-Laboratorio de Bacteriología. Carretera de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.
Tel. 963424000. Fax 963424001. e-mail: mlopez@ivia.es

La prevención es el mejor remedio para el control de las bacterias fitopatógenas, ya que los tratamientos químicos disponibles y autorizados se reducen en la práctica sólo a los productos cúpricos, cuya eficacia es generalmente mediana, ya que actualmente la legislación de la Unión Europea (UE) prohíbe la utilización de antibióticos en agricultura, a pesar de su demostrada eficacia, debido a los posibles riesgos de transferencia horizontal de genes de resistencia.

Los métodos de lucha preventiva frente a las bacterias fitopatógenas son múltiples, pero se basan esencialmente en: a) la aplicación de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas que permitan detectar las bacterias en el material vegetal; b) el análisis de las características de las cepas de cada especie y su comparación molecular con las de otros orígenes; c) el conocimiento de las fuentes de inóculo y los reservorios de cada bacteriosis en nuestras condiciones; d) el estudio de las estrategias de supervivencia de

las bacterias fitopatógenas en distintos hábitats; y e) el uso de tratamientos preventivos, entre los que destaca el control biológico.

En los últimos treinta años se ha incrementado en España el número de bacteriólogos dedicados a bacterias fitopatógenas. Ello ha permitido conocer con mayor exactitud el panorama real de las bacteriosis presentes en España y concentrar esfuerzos en el control de las más importantes. El número de bacterias fitopatógenas descritas en 2006 en España era ya de 50 y entre ellas destacan las consideradas como bacterias de cuarentena según la Directiva 2000/29, por el peligro potencial que suponen para la agricultura española.

Esta presentación del grupo del IVIA de Valencia pretende justificar la labor desarrollada en las distintas etapas del laboratorio, con algunos ejemplos de modelos bacterianos que se detallan a continuación y que se han explorado con cierta profundidad (**Cuadro inferior**).

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BACTERIAS FITOPATÓGENAS DEL INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS.



Ramón Peñalver Navarro es Doctor en Biología por la Universidad de Valencia (1994) y en la actualidad es Colaborador Científico Adjunto Interino en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), donde desarrolla estudios sobre los mecanismos implicados en el control biológico de la enfermedad de plantas producida por *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de los agentes de biocontrol K84 y K1026.



María Milagros López es Dr. Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia y Profesor de Investigación del IVIA. Ha realizado estancias en laboratorios del INRA de Angers (Francia) y el USDA de Florida (EEUU). Dirige el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, que es también el Laboratorio de Referencia de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura (actualmente de Medio Ambiente, Rural y Marino). Es miembro del panel de bacteriólogos de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* y miembro fundador de la *European Association of Phytobacteriologists*, así como actualmente presidenta de la Sociedad Española de Fitopatología.

Ester Marco-Noales es Doctora en Biología por la Universidad de Valencia (2000) y en la actualidad es Colaboradora Científica Adjunta en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, centrándose su investigación en aspectos epidemiológicos de diferentes bacteriosis, particularmente en las estrategias de supervivencia de algunas de las principales bacterias fitopatógenas, con especial énfasis en su supervivencia frente a condiciones de estrés ambiental.



Pablo Llop Pérez es Dr. en Biología por la Universidad de Valencia (2003) y actualmente es Colaborador Científico Adjunto en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, donde desarrolla investigaciones sobre nuevos métodos de detección molecular de bacterias, estudio de componentes genéticos presentes en plásmidos que controlan los factores de virulencia en *Erwinia amylovora* y estudios de supervivencia en *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por medio de marcadores moleculares y microarrays del genoma de la bacteria.

El grupo de Bacteriología del IVIA posee una dilatada experiencia investigadora reconocida a nivel nacional e internacional. Ha participado en más de 20 proyectos de I+D nacionales y en más de una decena financiados por la UE, así como en diversas Acciones Integradas o Proyectos de Colaboración. Como resultado de su investigación ha publicado más de 160 artículos científicos y de divulgación, y capítulos de libro. También se han impartido numerosas conferencias invitadas en Congresos nacionales e internacionales.

En el cuadro de la derecha se detallan las líneas de investigación que sigue el grupo.

Diagnóstico y caracterización

- Agrobacterium* spp.
- Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
- Erwinia amylovora*
- Ralstonia solanacearum*
- Xanthomonas citri* subsp. *citri*
- Xylophilus ampelinus*
- Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Biología y epidemiología

- Agrobacterium* spp.
- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
- Erwinia amylovora*
- Ralstonia solanacearum*
- Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Control

- Agrobacterium* spp.
- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

***Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (O EL RIESGO DE LAS INFECCIONES LATENTES)**

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* es el agente causal de la tuberculosis del olivo, que produce tumores en ramas y tronco (**Figura 1**), estando considerada como la tercera enfermedad del olivo en España en cuanto a las pérdidas que produce. Por eso, se abordó inicialmente la puesta a punto de varios métodos sensibles y específicos de diagnóstico molecular basados en PCR, incluido un protocolo “multiplex” que permite detectar simultáneamente dicha bacteria y cuatro virus que afectan a este cultivo (Bertolini et al., 2003). Estos protocolos desarrollados pueden ser aplicados a plantas con síntomas y a la detección de esta bacteria como epífita o endófita. Para ello se determinó, además, la metodología de muestreo más apropiada, y la época del año con máximos poblacionales (Quesada et al., 2007). También se demostró la diseminación natural del patógeno en plantaciones jóvenes y el riesgo que representa la introducción de plantas enfermas. Sin embargo, todavía no se aplican métodos de detección en plantas de vivero y se considera, erróneamente, que esta bacteria es ubicua y que por ello es inútil prevenir esta enfermedad.

El estudio de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas españolas de esta especie ha permitido, por un lado, seleccionar marcadores específicos que ayudarán a comprender aspectos epidemiológicos importantes para su prevención, y, por otro, determinar los patrones de diseminación de la tuberculosis del olivo en distintas zonas. Además, se ha demostrado la eficacia preventiva de los tratamientos cúpricos, tanto en la diseminación de las poblaciones epífitas de la bacteria, responsables de nuevas infecciones, como en la disminución de los síntomas.

Por último, la evaluación comparada de la sensibilidad de las distintas variedades principales de interés agrónomo permite aconsejar, para la plantación de olivares en zonas donde la enfermedad está presente, aquellas variedades menos sensibles (Penyalver et al., 2006).



Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en zona vascular de tallo de tomate. (Foto M.M. López).

***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (O EL RIESGO DE LAS SEMILLAS CONTAMINADAS)**

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* es el agente responsable del chancro bacteriano del tomate, enfermedad sistémica que produce marchitez y muerte de las plantas (**Figura 2**). Es la principal bacteriosis a nivel mundial de este cultivo, y está considerada como un organismo de cuarentena en la UE. Este patógeno había sido identificado esporádicamente en distintas zonas españolas desde 1978, pero desde 2000 han aparecido focos en Tenerife, Almería, Murcia, Valencia y Zaragoza. En varios casos se ha demostrado que la introducción de la enfermedad ha sido debida a semilla comercial contaminada, producida en países no comunitarios. La puesta a punto de nuevos métodos de diagnóstico y detección, como el inmuno-aislamiento, ha permitido aumentar la sensibilidad de los protocolos de detección de esta bacteria en las semillas, sin pérdida de fiabilidad. Esto es estrictamente necesario, ya que la baja tasa de contaminación de las semillas comerciales da lugar, con frecuencia, a falsos negativos. Los análisis mediante técnicas moleculares (ERIC-PCR, RAPD, BOX y AFLP) con cepas aisladas en distintos años en Canarias confirman la hipótesis de una única introducción (de León et al., 2009).

También se han evaluado distintos compuestos químicos comerciales, y combinaciones de varios de ellos, para el posible tratamiento preventivo, ya que, una vez desencadenada la infección sistémica, resulta prácticamente imposible su control.

***Xanthomonas citri* subsp. *citri* (O CÓMO LOS FRUTOS TRANSPORTAN BACTERIAS)**

Xanthomonas citri subsp. *citri* causa la cancrrosis de los cítricos, que es una de las enfermedades más graves que puede afectarlos, dado que produce manchas eruptivas foliares y en fruto, defoliación, caída de frutos, pérdida de vigor y, por tanto, de producción (**Figura 3**). Por todo ello está también considerada como bacteria de cuarentena según la legislación europea y, afortunadamente, todavía no está presente en ningún país del Mediterráneo. Por ello, el objetivo básico es impedir su introducción en España y en los otros países de la UE que cultivan cítricos. Como está prohibida la importación de cualquier material vegetal de propagación, excepto semillas, pero autorizada la importación de frutos sin síntomas, procedente de países donde la cancrrosis es endémica, los esfuerzos se concentran en impedir su introducción mediante frutos contaminados. Para ello se ha colaborado con otros países en la puesta a punto de un protocolo integrado de diagnóstico basado en técnicas de PCR de alta especificidad (Golmohammadi et al., 2007) y en métodos serológicos y de aislamiento, que ha sido adoptado como oficial por la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Su aplicación ha permitido identificar esta bacteria en frutos importados de distintos países sudamericanos, y proceder a su destrucción, o impedir su entrada en los mercados de la UE.

La supervivencia de la bacteria en lesiones de frutos también ha sido estudiada mediante la selección del gen *gumD* como marcador de viabilidad, y la puesta a punto de protocolos de detección del RNA mensajero mediante PCR a tiempo real y NASBA, que permitan estudiar el efecto de distintos tratamientos químicos o físicos de los frutos sobre la viabilidad de este patógeno.

***Ralstonia solanacearum* (O CÓMO SOBREVIVIR FUERA DEL HUÉSPED)**

R*alstonia solanacearum* causa podredumbre y marchitez en las solanáceas cultivadas, pero también en plantas de más de cincuenta familias (**Figura 4**). Por la gravedad de sus síntomas y las pérdidas que ocasiona es asimismo un organismo de cuarentena, según la legislación de la UE. Se trata de una de las bacterias más adaptadas para sobrevivir en distintos hábitats, ya que, además de en las plantas, es capaz de mantenerse en variados tipos de suelo durante largos períodos, así como en cursos de agua, siendo una de las bacterias más peligrosas para la agricultura. Este organismo no había sido citado en España hasta 1995, pero desde entonces se han identificado distintos focos, especialmente en patatas importadas y de producción nacional, y también se ha identificado en tomate y aguas de Castilla-León y Andalucía.

Para prevenir su introducción en España, se han puesto a punto métodos serológicos de detección de elevada sensibilidad, basados en anticuerpos monoclonales específicos, y métodos moleculares basados en PCR. Pueden ser aplicados tanto a la detección de la bacteria en material vegetal sin síntomas, como tubérculos de patata o esquejes de geranio (Marco-Noales et al., 2008), como a su detección en agua, y son aplicados por laboratorios de distintas comunidades autónomas (CC.AA.).

El estudio de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas españolas ha permitido determinar que se trata de cepas de la raza 3, biovar 2, filotipo 2, y que han sido varias las introducciones identificadas en nuestro país. En la mayoría de los casos, el origen del inóculo pare-

ce estar constituido por tubérculos de patata de procedencia sudamericana o europea.

Se ha estudiado la supervivencia de cepas españolas de *R. solanacearum* en agua de riego, y la influencia de la microbiota nativa, especialmente de fagos específicos, en su supervivencia, así como el efecto de bajas temperaturas (Álvarez et al., 2007). Se ha demostrado que en agua de río, a temperaturas inferiores a 15°C, la bacteria adopta el “estado viable no cultivable” (VNC), y que dicho estado es reversible cuando aumenta

la temperatura. Además, se ha observado correlación entre cultivabilidad y patogenicidad.

La prevención de la introducción y diseminación de *R. solanacearum* está regulada mediante la Directiva 2006/63 de la UE, que obliga a realizar análisis y en caso positivo a erradicar. Entonces, no es posible cultivar plantas sensibles en los cuatro años siguientes y, por eso, se ha estudiado la migración de una cepa marcada de *R. solanacearum* en distintas plantas cultivadas y para determinar su sensibilidad (Álvarez et al., 2008). Los resultados de la erradicación en España hasta ahora han sido satisfactorios, pero los riesgos de nuevas introducciones, y especialmente los focos de los ríos y arroyos, suponen un peligro constante.

***Erwinia amylovora* (O LAS BASES DE UNA ERRADICACIÓN EFICAZ)**

E*rwinia amylovora*, también patógeno de cuarentena en la UE, es responsable de la enfermedad denominada fuego bacteriano, que afecta especialmente a peral, manzano, níspero, membrillero y rosáceas ornamentales (**Figura 5**). En España fue identificada por primera vez en 1995 en Guipúzcoa. La necesidad de realizar prospecciones intensivas en todas las zonas de cultivo de especies sensi-



Figura 4. Síntoma de marchitez causada por *Ralstonia solanacearum* en patata. (Foto M.M. López).



Figura 3. Síntomas de lesiones causadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en naranja. (Foto P. Llop).

bles obligó a diseñar técnicas serológicas basadas en anticuerpos monoclonales específicos, y técnicas moleculares basadas en nested-PCR en un solo tubo (Llop et al., 2000), que fueron transferidas a los Servicios de Sanidad Vegetal. También forman parte del protocolo oficial de la EPPO y del de la *International Plant Protection Convention* de la FAO, que está en revisión.

Desde entonces se han detectado distintos focos en



Figura 5. Síntomas de *Erwinia amylovora* en brote (arriba) y fruto de peral (debajo). (Fotos E. Marco-Noales).

nueve CC.AA. del norte y centro de España y se han llevado a cabo medidas de erradicación. Se ha considerado que la erradicación era la solución preferible dado el pequeño tamaño de los focos y la abundancia de variedades sensibles en las zonas afectadas.

Para conseguir una erradicación eficaz, aunque a largo plazo, es necesario conocer las fuentes de inóculo y los reservorios de la bacteria problema, sus estrategias de supervivencia y sus medios de diseminación. Por ello se han estudiado las características de las cepas españolas de distintos orígenes en un análisis polifásico utilizando varias técnicas moleculares (RAPD, MSP-PCR, PFGE, AFLP), que han permitido concluir que ha habido varias introducciones de *E. amylovora* en España, estando algunas de ellas directamente relacionadas con la importación de plantas de países de la UE, pero se desconoce el origen exacto de otros focos (Donat et al., 2007). En estos trabajos también se han encontrado cepas con características especiales, carentes del plásmido pEA29, considerado universal, pero con otro plásmido no previamente descrito, denominado pEl70, así como una nueva especie de *Erwinia*, denominada *Erwinia piriflorinigrans*. Además se ha demostrado la capacidad de *E. amylovora* de sobrevivir en agua y en brotes, y manzanas maduras (Ordax et al., 2009). También se ha visto que la bacteria entra en estado VNC en condiciones de estrés por cobre y por falta de nutrientes (Ordax et al., 2006), recuperando la cultivabilidad y también la patogenicidad cuando desaparece el estrés.

Hasta ahora se ha demostrado la eficacia de la erradicación en varias zonas, probablemente debido a la detección temprana de la bacteria. Ello es especialmente relevante ya que se trata de la primera vez que se ha conseguido la erradicación de esta grave enfermedad en un área determinada.

Agrobacterium tumefaciens (O CÓMO EL CONTROL BIOLÓGICO PUEDE SER EFICAZ)

El primer ejemplo práctico de métodos de lucha preventiva se aplicó al patosistema *Agrobacterium tumefaciens*-plantas de vivero, que aún se sigue estudiando en nuestro grupo. *A. tumefaciens* es la bacteria causante de tumores en cuello, raíces y con menor frecuencia en tallo (Figura 6), teniendo un amplio espectro potencial de huéspedes, ya que puede abarcar a más de 700 especies de plantas. En España, esta enfermedad es conocida desde principios del siglo XX, y ha sido citada en gran cantidad de frutales y ornamentales. Aparte de los daños directos a la planta, las pérdidas en viveros de frutales, vid y rosas son especialmente graves, ya que no se pueden comercializar lotes que contengan plantas con tumores.

Los estudios realizados han permitido la puesta a punto de protocolos sensibles y específicos de diagnóstico en plantas con tumores para la detección de infecciones latentes, basados inicialmente en PCR convencional con control interno (Cubero et al., 1999) y recientemente en PCR a tiempo real. Además se han diseñado técnicas de tipado específico mediante RAPD (Llop et al., 2003), y se

ha profundizado en el conocimiento de la biología de la bacteria en distintos huéspedes, como la vid, y su capacidad de migración en frutales y rosal.

Pero los avances más significativos han tenido lugar en el control biológico de esta enfermedad, demostrándose la eficacia de dicho método y estudiándose los mecanismos implicados en el mismo, tanto en la cepa original de *Agrobacterium* sp. K84, como su sucesora modificada genéticamente, la cepa K1026. Ambas han resultado eficaces frente a distintas cepas patógenas españolas, en distintos huéspedes y condiciones (Penyalver *et al.*, 2000). Además se ha demostrado la importancia de la transferencia de plásmidos entre el agente de biocontrol y el patógeno en este sistema de control biológico (Vicedo *et al.*, 1996), y se ha estudiado el comportamiento de cepas transconjugantes (López-López *et al.*, 1999).

A pesar de su eficacia práctica, no se ha conseguido todavía el registro de la cepa K1026 en la UE, con lo que se da la paradoja de que existiendo una cepa eficaz, conocimiento científico y técnico que lo avala, y carencia práctica de riesgo, no se ha conseguido todavía su registro en la UE, por lo que dicha cepa no está todavía a disposición de los viveristas españoles ni europeos.



Figura 6. Síntomas de tumores en cuello y raíces causados por *Agrobacterium tumefaciens* en rosal. (Foto M.M. López).

CONCLUSIONES (O LAS DIFICULTADES PRÁCTICAS DE LA PREVENCIÓN)

Todos estos ejemplos nos ilustran sobre la absoluta necesidad de utilizar los métodos de control preventivo de bacteriosis de plantas para reducir la importancia económica de las pérdidas que causan en España. Sin embargo, los estudios realizados sobre estas enfermedades, tanto aquí, como en otros países, nos demuestran que la puesta a punto de métodos sensibles y específicos de detección (López *et al.*, 2008) parece ser más sencilla que el diseño de métodos eficientes de muestreo. La identificación de nuevos reservorios o estrategias de supervivencia no previamente descritas tiene un elevado interés científico, pero nos hace sospechar que la gran capacidad de adaptación de las bacterias les permitirá sobrevivir en condiciones muy adversas por largos períodos de tiempo, haciendo más difícil su control preventivo. Y que el mejor método de diagnóstico o detección no será eficaz si no se aplica a una muestra representativa y tomada adecuadamente.

La información sobre la diversidad genética de las cepas españolas de distintas especies de bacterias fitopatógenas ha resultado del máximo interés, ya que las técnicas moleculares utilizadas han permitido distinguir si se trataba de una o varias introducciones y establecer, en función de ello, las estrategias de control o erradicación más apropiadas. El mayor problema es que, mientras se consigue una colección representativa de aislados y se seleccionan las técnicas de análisis más convenientes en cada modelo, ese tiempo puede resultar crucial para controlar la diseminación de la bacteria, lo que es especialmente grave en el caso de organismos de cuarentena.

Además, el control biológico no parece ser de momento la panacea universal para el control de bacteriosis de plantas y, desgraciadamente, los brillantes resultados conseguidos con las cepas K84 y K1026 son más bien la excepción que la regla, ya que no existen muchos más casos de bacteriosis en las que el control biológico se haya mostrado eficaz en su utilización práctica, desplazando al control químico.

Estas conclusiones sólo pretenden ser realistas, y señalar el largo camino que todavía queda por recorrer para que la prevención efectiva de las bacteriosis de plantas sea un hecho y permita evitar las pérdidas causadas por las mismas. Ahora, en 2009, ya sabemos qué problemas nos plantean las bacterias fitopatógenas y pretendemos aportar información científica que permita avanzar, quizás lentos, pero seguros, hacia su prevención, control y erradicación.

REFERENCIAS

- Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Démery D, López MM y Trigalet A. (2008) Comparative behaviour of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* **98**: 59-68.
- Álvarez B, López MM y Biosca EG. (2007) Influence of native microbiota on survival of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in river water microcosms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7210-7217.
- Bertolini E, Olmos A, López MM y Cambra M. 2003. Multiplex nested RT-PCR in a single closed tube for sensitive and simultane-

- ous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* **93**: 286-292.
- Cubero J, Martínez MC, Llop P y López MM. (1999) A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J Appl Microbiol* **86**: 591-602
- de León L, Rodríguez A, Llop P, López MM y Siverio F. (2009) Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* sbsp. *michiganensis* isolates from Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathology* (en prensa).
- Donat V, Biosca EG, Peñalver J y López MM. (2007) Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol* **103**: 1639-1649.
- Golmohammadi M, Cubero J, Peñalver J, Quesada JM, López MM y Llop P. (2007) Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *J Appl Microbiol* **103**: 2309-2315.
- López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M y Bertolini E. (2008) Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Curr Iss Mol Biol*. **13**: 46.
- López-López MJ, Vicedo B, Orellana N, Piquer J y López MM. (1999) Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition. *Phytopathology* **89**: 286-292.
- Llop P, Bonaterra A, Peñalver J y López MM. (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2071-2078.
- Llop P, Lastra B, Marsal H, Murillo J y López MM. (2003) Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumours. *Eur J Plant Path* **109**: 381-389.
- Marco-Noales E, Bertolini E, Morente C y López MM. (2008) Integrated approach for detection of non culturable cells of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic *Pelargonium* spp. cuttings. *Phytopathology* **98**: 949-955.
- Ordax M, Biosca EG, Wimalajeewa SC, López MM y Marco-Noales E. (2009) Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *J Appl Microbiol*. (en prensa).
- Ordax M, Marco-Noales E, López MM y Biosca EG. (2006) Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3482-3488.
- Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E, Quesada JM, Salcedo CI, Piquer J, Pérez-Penadés J, Carbonell EA, del Río C, Caballero JM y López MM. (2006) Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology* **96**: 313-319.
- Penyalver R, Vicedo B y López MM. (2000) Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *Eur J Plant Pat* **106**: 801-810.
- Quesada JM, García A, Bertolini E, López MM y Penyalver R. (2007) Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *Int Microbiol* **10**: 77-84.
- Vicedo B, Lopez MJ, Asins MJ y Lopez MM. (1996) Spontaneous transfer of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the nopaline catabolism plasmid of *A. radiobacter* strain K84 in crown gall tissue. *Phytopathology* **86**: 528-534.